

利用栽培稻基因组 DNA 对非洲野生稻 进行染色体荧光原位杂交分析*

邱小芬¹ 刘虹^{1,2} 覃瑞^{1,2} 陈雁^{1,2**}

1. 中南民族大学生命科学院, 武汉 430074; 2. 南方少数民族地区生物资源保护与综合利用工程中心, 武汉 430074

摘要 以地高辛标记的栽培稻基因组(基因组为 AA)DNA 为探针,对非洲野生稻(基因组为 BBCC)的体细胞染色体进行荧光原位杂交分析,研究 AA 染色体组和 BBCC 染色体组之间的关系,同时对杂交后的染色体进行同源染色体配对。结果表明,栽培稻 A 基因组和非洲野生稻基因组有较高的同源性,其中高度重复 DNA 序列在栽培稻和非洲野生稻间具有保守性。

关键词 栽培稻; 非洲野生稻; 基因组原位杂交(GISH)

中图分类号 S 511.035.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0537-04

稻属(*Oryza*)属于禾本科(Gramineae)稻亚科(Oryzoideae),包括 2 个栽培种及 20 余个野生种,其染色体组分别为 AA、BB、EE、FF、GG、BBCC、CC、CCDD、HHJJ 和 HHKK,广泛分布于全球热带和亚热带地区^[1-3]。许多性状在稻属种间差异很小,而种内变异较大,另外种间杂交事件和多倍体普遍存在^[4]。为了便于稻属植物中种的界定并合理体现各个种之间的关系,Vaughan 等^[5-6]把稻属分成 4 个复合体,即栽培稻复合体(*O. sativa complex*)、药用野生稻复合体(*O. officinalis complex*)、马来野生稻复合体(*O. ridleyi complex*)和疣粒野生稻复合体(*O. meyeriana complex*)。

基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)是鉴别和验证异源多倍体的基因组组成、分析异源多倍体基因组的起源和进化以及不同基因组相互关系的简便而有效的技术之一^[7]。本试验以栽培水稻(*O. sativa*)这一模式生物的基因组 DNA 为探针,在不封阻的情况下,对非洲野生稻进行 GISH 分析,研究 AA 基因组和四倍体 BBCC 基因组之间的关系。AA 基因组是稻属的基本染色体组^[8],并且广泛分布于各大陆^[9-10],因此,利用 AA 基因组 DNA 为探针进行 GISH 分析,能够得到有关非洲野生稻异源四倍体基因组构成和染色体组间进化关系等方面的重要信息。

1 材料与方法

1.1 植物材料和染色体制片

供试材料栽培稻(*O. sativa*)品种广陆矮 4 号和非洲野生稻(*O. schweinfurthian*) IRW31 由华南农业大学卢永根院士提供,染色体制片分别参照 Ren 等^[11]的方法略加改进。取生长旺盛的非洲野生稻植株根尖在乙醇卡诺固定液(乙醇与冰乙酸体积比为 3:1)中固定 2 h 以上,充分水洗后,用 1% 纤维素酶(Cellulase “Onozuka R210”, Duchefa)和 1% 果胶酶(Pectinase, Calbiochem)28 °C 酶解 4~5 h,再用卡诺液固定。火焰干燥法制片,镜检后-20 °C 下保存备用。

1.2 基因组总 DNA 提取及探针制备

CTAB 法提取栽培稻基因组总 DNA,参照 Doyle 等^[12]的方法稍作修改。栽培稻总 DNA 采用切刻平移试剂盒方法(Nick Translation Kit, Roche)进行标记,用 digoxigenin-11-dUTP (Roche)标记探针。20 μL 反应体系中含有 dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dig-11-dUTP、Dnase I、DNA 聚合酶 I、0.2~0.5 μg 探针 DNA,15 °C 下标记 1.5~3.0 h,通过凝胶电泳检测其探针为 200~500 bp 大小的长度,然后加入 1 μL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)终止反应。抗地高辛蛋白的碱性磷酸酶的点印迹法检测标记。

收稿日期:2010-02-11; 修回日期:2010-07-05

* 国家民委科研基金(05ZN011)和中南民族大学自然科学基金项目(YZY09002, YZZ10002)资助

** 通讯作者. E-mail: chenyan_bio@126.com

邱小芬,女,1982 年生,硕士研究生. 研究方向:植物遗传. E-mail: qiuxiaofen@hotmail.com

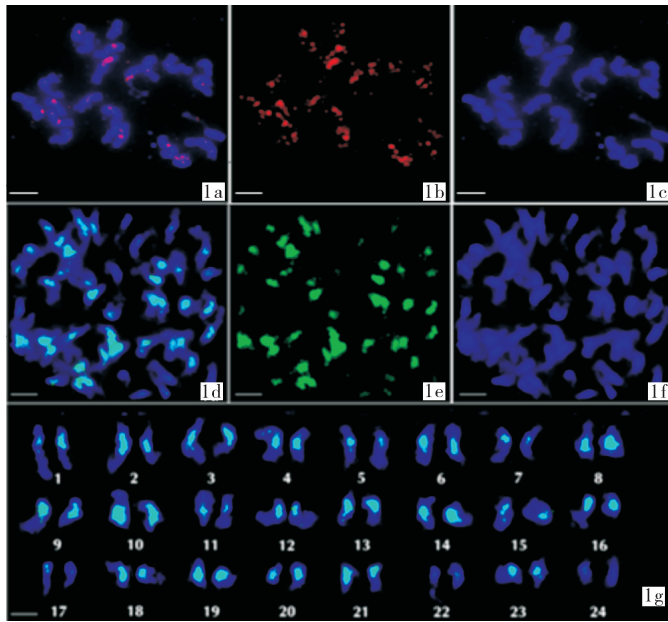
1.3 原位杂交及检测

荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 方法分别参阅 Jiang 等^[13] 和 Li 等^[14-15] 的方法。染色体于 60 °C 烤片 1 h 制片, RNase A/2×SSC (10 μg/mL) 37 °C 处理 1 h, 2×SSC 室温漂洗 10 min, 胃蛋白酶 10 mmol/L HCl (5 μg/mL) 处理 15 min, 2×SSC 室温漂洗 10 min, 甲醛/1×PBS 室温固定 10 min, 70% 甲酰胺 70 °C 变性 3.5~5.0 min, -20 °C 用 70%、95% 和 100% 乙醇各脱水 5 min, 室温晾干。杂交液含 80 ng 标记的探针 DNA, 50% 去离子甲酰胺 (Sigma), 8% 的硫酸葡聚糖 (Amresco), 2×SSC, 0.5% SDS, 0.5 μg 鲑鱼精 DNA (DNA Salmon, Sigma)。37 °C 杂交过夜。杂交信号的检测: 42 °C 下 20% 甲酰胺, 2×SSC, 0.2×SSC 洗脱, 室温 0.1% TritonX-100 (Sigma) 处理 5 min, 室温 1×PBS 洗脱并凉干片子。每张片子加入 anti-digoxigenin-FITC (Rockland), 37 °C 温育 1 h, 1×PBS 室温洗涤 3 次, 每次 5 min。10 μg/mL DAPI (Sigma) 复染, Olympus BX61 荧光显微镜观察, 用 Case

Data Manager Expo 2.1.1 图像系统控制的 Cool-1300QS CCD (VDS, Germany) 照相系统摄取图片。

2 结果与分析

利用 streptavidin-Cy3y 标记的栽培稻广陆矮 4 号基因组总 DNA 作为探针, 对自身中期染色体进行原位杂交 (图 1a-1c), 结果显示, 在高洗脱条件下, 栽培稻 AA 基因组探针的杂交信号主要集中在着丝粒部位, 其他部位杂交信号很弱。用地高辛标记的栽培稻 AA 基因组 DNA 探针对非洲野生稻中期染色体进行原位杂交 (图 1e-1f), 结果显示, 在 48 条非洲野生稻染色体中, 除了 1 条染色体外, 大部分染色体被喷涂成明亮的绿色, 杂交信号主要集中在每条染色体的着丝粒和近着丝粒或者是端部和近端部区域, 说明栽培稻 A 基因组和非洲野生稻基因组有较高的同源性, 其中高度重复 DNA 序列在栽培稻和非洲野生稻间具有保守性。但是同时也可以观察到, 绿色信号并没有覆盖整个染色体, 说明非洲野生稻 BBCC 基因组具有较大的种的特



1a. 栽培稻 DAPI 复染的染色体和杂交信号的合成图 GISH image combineing chromosomes and signals of *O. sativa* L.; 1b. AA gDNA 在自身染色体上的杂交信号 Hybridization signals of *O. sativa* L. with AA gDNA as probe; 1c. 栽培稻 DAPI 复染的染色体 Image of *O. sativa* L. chromosomes stained with DAPI; d-f. 利用地高辛标记的栽培稻 (AA) 基因组 DNA 探针对非洲野生稻的 GISH 分析 GISH analysis on *O. schweinfurthian* with digoxigenin-labelled genomic DNA from *O. sativa* L.; 1d. AA gDNA 在自身染色体上的杂交信号非洲野生稻 DAPI 复染的染色体和杂交信号的合成图 GISH image combineing chromosomes and signals of *O. schweinfurthian*; 1e. AA gDNA 在非洲野生稻染色体上的杂交信号 Hybridization signals of *O. schweinfurthian* with AA gDNA as probe; 1f. 非洲野生稻 DAPI 复染的染色体 Image of *O. schweinfurthian* chromosomes stained with DAPI; 1g. 基于 GISH 图像的非洲野生稻核型图 Karyotype image of *O. schweinfurthian* (标尺=5 μm bar=5 μm).

图 1 利用生物素标记的栽培稻 (AA) 基因组 DNA 探针对自身中期染色体的 GISH 分析

Fig. 1 GISH analysis on *O. sativa* L. with biotin-labelled genomic DNA from *O. sativa* L. under high wash stringency

异性。

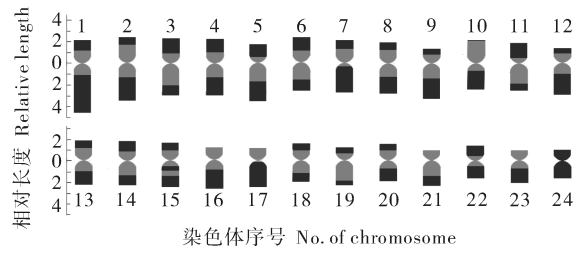
通过对非洲栽培稻的核型分析结果进行统计分析(表 1)和核型模式图构建(图 2),结果显示,最长的第 1 号染色体相对长度达到 6.56,最短的第 24 号染色体为 2.54,相对长度在 3.0 下的有 3 个,在 3.0~4.0 之间的有 8 个,在 4.0~5.0 之间的有 8 个,在 5.0 以上的有 5 个。臂比值最大的为第 21 号染色体,为 2.643,臂比值在 2.0 以上的还有第 1、5、9、12、16、17、19、21、23 号染色体,因此它们的染色体类型为近中着丝粒染色体;其他染色体的臂比值都小于 2.0,其中最小的是第 11 号染色体,臂比值为 1.118。这些染色体类型为中部着丝粒染色体。核型和杂交信号模式图也显示了不同染色体的着丝粒类型,同时显示多数染色体的杂交信号都分布在着丝粒两侧,只有第 15 号染色体在长臂上还有一个额外的杂交信号带。第 11 和 19 号染色体的杂交信号主要分布在长臂上,第 7、10 和 17 号染色体的杂交信号主要分布在短臂上。另外第 16、17、21、和 23 号染色体的短臂全部被杂交信号覆盖,在第 24 号染色体上没有杂交信号分布。

表 1 非洲野生稻的核型分析

Table 1 Karyotype analysis of *O. schweinfurthian*

序号 Serial number	相对长度/% (短臂+长臂=全长) Relative length(Short arm+ Long arm=Full length)	臂比 Ratio of arm	类型 ¹⁾ Type
1	2.10+4.55=6.66	2.118	sm
2	2.29+3.40=5.69	1.486	m
3	2.23+2.85=5.08	1.278	m
4	2.17+2.91=5.08	1.343	m
5	1.67+3.40=5.07	2.037	sm
6	2.23+2.54=4.77	1.139	m
7	2.04+2.66=4.70	1.303	m
8	1.86+2.72=4.58	1.467	m
9	1.30+3.22=4.52	2.476	sm
10	2.10+2.35=4.45	1.118	m
11	1.86+2.48=4.34	1.333	m
12	1.30+2.85=4.15	2.190	sm
13	1.79+2.23=4.02	1.241	m
14	1.79+2.17=3.96	1.207	m
15	1.61+2.35=3.96	1.462	m
16	1.11+2.60=3.71	2.333	sm
17	1.11+2.41=3.52	2.167	sm
18	1.55+1.92=3.47	1.240	m
19	1.18+2.23=3.41	1.895	sm
20	1.55+1.79=3.34	1.160	m
21	0.87+2.29=3.16	2.643	sm
22	1.36+1.55=2.91	1.136	m
23	0.87+2.04=2.91	2.357	sm
24	0.99+1.55=2.54	1.563	m

1)sm:近中部着丝粒区 Submedian region; m:中部着丝粒区 median region.



浅绿色代表杂交信号分布区,蓝色为非信号区 Aqua represents signal location, no signal is situated blue area.

图 2 利用地高辛标记的栽培稻(AA)基因组

DNA 探针对非洲野生稻的 GISH 杂交结果核型模式图

Fig.2 Idiogram of *O. schweinfurthian* with digoxigenin-labelled genomic DNA from *O. sativa* L.

3 讨论

A 基因组是基本染色体组^[16],与 B、C 基因组都有一定的亲缘关系。高露等^[17]的研究表明,在进化上,AA 与 CC 基因组之间的亲缘关系较 BB 与 AA 和 CC 基因组之间的关系更近。而 Nishikawa 等^[18]通过系统进化分析得出 B 与 A 的关系比 B 与 C 的关系更近。从图 1 可以看出,非洲野生稻 23 对染色体上都有 A 基因组的信号,这在某种程度上,再次验证了 A 基因组是稻属基础的染色体。杂交信号的分布呈现特异性,多分布在端粒及着丝粒区,与 AA 基因组对自身染色体杂交的结果一致,而端粒和着丝粒区主要由串联重复序列组成,说明中高度重复序列在不同种中也存在着高度同源性和保守性,并在进化过程中得以保存下来^[19-20],而没有信号的 24 号染色体可能来源于与 A 基因组亲缘关系较远的 B 基因组。Ge 等^[3]根据多基因序列分析,推断出 BBCC 染色体组由 BB 基因组物种作为母本杂交形成,因此,可以推测 BBCC 的染色体组保留有 BB 基因组的一些特征,通过比较 BBCC 与其二倍体祖先的基因组特征,可以提供进化方面的启示。但是由于稻属染色体小,形态相似,核型分析存在一定的偏差,故单纯地依靠非洲野生稻与斑点野生稻核型数据的比较,区分 BBCC 基因组中 B、C 基因组是不具说服力的,可以在本实验的基础上,通过调整杂交严谨度方法鉴定 BBCC 基因组中的 BB 和 CC 基因组,以此比较二倍体进化到四倍体过程中核型的变化,进而推测进化事件。

参 考 文 献

[1] LU B R. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): a historical

- perspective and current status[J]. Intern Rice Resour Notes, 1999,24:4-8.
- [2] AGGARWAL R K, BRAR D S, KHUSH G S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization [J]. Mol Gen Genet, 1997, 254: 1-12.
- [3] GE S, SANG T, LU B R, et al. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 14400-14405.
- [4] 卢宝荣, 葛颂, 桑涛. 稻属分类的现状及存在问题[J]. 植物分类学报, 2001, 39: 373-388.
- [5] VAUGHAN D A. The genus *Oryza* L. current status of taxonomy [J]. IRRI Res Paper Series, 1989, 138: 1-21.
- [6] VAUGHAN D A, MORISHIMA H, KADOWAKI K. Diversity in the *Oryza* genus [J]. Curr Opin Plant Biol, 2003(6): 139-146.
- [7] 余舜武, 李荣田, 章荣德, 等. Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因在水稻上的荧光原位杂交[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(1): 1-4.
- [8] KATAYAMA T. Cytogenetic studies on the genus *Oryza*. The F1 hybrids of the crosses BBCC \times CC, BBCC \times a diploid strain of *O. punctata* and CC \times a diploid strain of *O. punctata* [J]. Proc Japa Acad, 1967, 43: 327-331.
- [9] 冯九焕, 赵杏娟, 卢永根. 稻属 (*Oryza* L.) 植物染色体组命名的历史回顾[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(4): 365-370.
- [10] 郭亚龙, 葛颂. 稻族的系统发育及其研究进展[J]. 植物分类学报, 2006, 44(2): 211-230.
- [11] REN N, SONG Y C, BI X Z, et al. The physical location of genes *cdc2* and *prh1* in Maize (*Zea mays* L.) [J]. Hereditas, 1997, 126: 2112-2117.
- [12] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 132-15.
- [13] JIANG J M, GILL B S, WANG G L, et al. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 4487-4491.
- [14] LI C B, ZHANG D M, GE S, et al. Identification of genome constitution of *Oryza malampuzhaensis*, *O. minuta*, and *O. punctata* by multicolor genomic in situ hybridization [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 204-211.
- [15] LI C B, ZHANG D M, GE S, et al. Differentiation and inter-genomic relationships among C, E and D genomes in the *Oryza officinalis* complex (Poaceae) as revealed by multicolor genomic in situ hybridization [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 197-203.
- [16] NAYAR N M. Origin and cytogenetics of rice [J]. Adv Genet, 1973, 17: 153-159.
- [17] 高露, 王德彬, 覃瑞. 栽培稻、斑点野生稻、药用野生稻基因组比较分析 [J]. 湖北农业科学, 2007, 46(4): 491-494.
- [18] NISHIKAWA T, VAUGHAN D A, KADOWAKI K. Phylogenetic analysis species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes [J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 696-705.
- [19] 蓝伟侦, 覃瑞, 李刚, 等. 利用 C 基因组 *C₀t-1* DNA 比较分析稻属 A, B, C, D 基因组 [J]. 科学通报, 2006, 51(12): 1422-1431.
- [20] JIN W W, JULIANA R, KIYOTAKAS, et al. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat [J]. The Plant Cell, 2004, 16: 571-581.

Fluorescence *in situ* Hybridization of *Oryza schweinfurthian* Chromosomes with Genomic DNA from *O. sativa*

QIU Xiao-fen¹ LIU Hong^{1,2} QIN Rui^{1,2} CHEN Yan^{1,2}

1. College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2. Engineering Research Center of Protection and Utilization for Biological Resources in Minority Regions, Wuhan 430074, China

Abstract Genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis on *Oryza schweinfurthian* with digoxigenin-labelled genomic DNA from *O. sativa* was used to study the relationship between the A genome of *O. sativa* and BC genome of *O. schweinfurthian*. Karyotype analysis was made based on the similar band patterns of the hybridization signal. The result showed that A genome of cultivated rice had higher homology with genome of African wild rice, including repetitive DNA sequence conserved between cultivated rice and African wild rice.

Key words *O. sativa*; *O. schweinfurthian*; genomic *in situ* hybridization (GISH)

(责任编辑: 杨锦莲)